

10/031068



REC'D 13 SEP 2000

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

EP00/06513

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

E U

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 29 JUIN 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis. rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **16 JUL 1 9**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **990925**
DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **16 JUL 1999**

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

CABINET de BOISSE ET COLAS
CONSEILS
en PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
37, Avenue Franklin-Roosevelt
75008 PARIS

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone

Ca 1788/ST/FR

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☐ demande initiale

☐ brevet d'invention

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**SYSTEME CAPTEUR BIOCHIMIQUE A SENSIBILITE ACCRUE PAR AMPLIFICATION
MOLECULAIRE DU SIGNAL.**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

**CSEM Centre Suisse d'Electronique et de
Microtechnique SA**

Forme juridique

Société Anonyme

Nationalité (s) **Suisse**

Adresse (s) complète (s)

**Rue Jaquet-Droz 1
CH-2007 NEUCHATEL**

Pays

SUISSE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

**G. CARON
C.P.I.
n° 94 1204**

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 09258

TITRE DE L'INVENTION :

**SYSTEME CAPTEUR BIOCHIMIQUE A SENSIBILITE ACCRUE PAR
AMPLIFICATION MOLECULAIRE DU SIGNAL.**

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

**CSEM Centre Suisse d'Electronique et de Microtechnique SA
Rue Jaquet-Droz 1
CH-2007 NEUCHATEL
SUISSE**

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

**Sigrist Hans
Im Holz 91
CH-3309 Kernenried
SUISSE**

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

22/07/99



G. CARON

C.P.I.

no. 94 1204

SYSTEME CAPTEUR BIOCHIMIQUE A SENSIBILITE ACCRUE
PAR AMPLIFICATION MOLECULAIRE DU SIGNAL

La présente invention a pour objet un système capteur biochimique dont la sensibilité est accrue par une amplification moléculaire d'un signal initialisé par l'interaction entre une entité biochimique présente dans une solution ou un fluide biologique et un réactif immobilisé sur le substrat du capteur et ayant une affinité spécifique pour ladite entité biochimique.

En matière de capteurs biologiques, on recherche de plus en plus des systèmes qui permettent de faire encore reculer les limites de détection et de dosage d'entités biochimiques dans des fluides biotiques, dans l'espoir d'obtenir une très grande sensibilité de détection. A cet effet, les perfectionnements technologiques ont porté non seulement sur l'environnement instrumental, par exemple sur les limites de détection d'un signal, mais aussi sur la conception même du capteur dès lors qu'on avait atteint les limites de sophistication au niveau instrumental. Mais là encore, les perfectionnements au niveau du capteur ont atteint un seuil au delà duquel il n'est plus possible de détecter des biomolécules à l'état de traces, seuil qui est de l'ordre du nanomolaire (nM) ou du picomolaire (pM).

Néanmoins d'autres perfectionnements ont permis de rendre le signal d'un capteur, jusqu'alors indétectable par les technologies antérieures, mesurable grâce à une amplification du signal sur lequel repose le principe de détection. Une telle amplification trouve son application préférée dans le domaine des capteurs biologiques étant donné que les conditions mises en oeuvre dans l'analyse biologique sont compatibles avec les systèmes de bioamplification.

Actuellement, deux modes de bioamplification sont employés dans des systèmes destinés à détecter, par exemple, des réactions immunologiques. Selon un premier mode d'amplification, dans les tests ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays), la molécule à détecter, par exemple un anticorps qui interagit avec une entité chimique tel qu'un antigène immobilisé, est chimiquement liée à une enzyme. L'enzyme sert à catalyser la transformation des molécules détectables. Dans les systèmes ELISA couramment utilisés, les enzymes qui catalysent la production d'entités chimiques sont presque toujours des hydrolases.

Les produits de réaction solubles dans l'eau sont de préférence détectés dans l'ensemble du milieu réactionnel en mesurant l'absorption, la luminescence ou la bioluminescence.

Dans les biocapteurs, on obtient un deuxième mode d'amplification en augmentant le nombre ou la masse des espèces détectées. Ce principe d'amplification est réalisé par exemple en liant des marqueurs de masse à la molécule à détecter.

Si le principe de détection repose sur la fluorescence ou l'absorption, des molécules fluorescentes ou absorbantes sont chimiquement liées à l'entité chimique. A titre d'exemple d'amplification de ce type, on peut citer le brevet US 5,175,270 qui décrit un mécanisme d'amplification à partir d'une architecture dendrimère à la surface du capteur. La liaison de molécules modifiées sur chaque molécule cible, ou la liaison de réactifs secondaires marqués (par exemple des colloïdes, nanoparticules ou des anticorps secondaires marqués avec un fluorophore) produira une amplification linéaire du signal. Des billes de latex, des composés nanonocristallins semi-conducteurs ou de l'or colloïdal sont des marqueurs de masse couramment utilisés dans les systèmes biocapteurs. Dans des systèmes d'amplification commerciaux, des anticorps secondaires fortement marqués par des molécules fluorescentes contribuent à augmenter le signal linéairement.

En général, les systèmes usuels amplifient les signaux du capteur par des réactions catalysées par une enzyme qui augmente le nombre d'entités chimiques secondaires de l'ensemble par catalyse (amplification catalytique pour une détection globale). Autrement, on augmente les signaux du capteur soit en ajoutant de la masse, pour une détection sensible à la masse, soit en augmentant le nombre de molécules marquées qui sont liées à l'unité.

A titre d'exemple d'amplification linéaire à la surface d'un capteur, on peut citer l'amplification d'un signal de fluorescence : dans ce système les anticorps secondaires sont conjugués pour permettre la détection de cibles en faible quantité.

Ces deux modes d'amplification qui viennent brièvement d'être rappelés ont permis d'augmenter sensiblement, soit en solution soit sur une surface, la sensibilité de détection : ils ne permettent cependant pas d'obtenir un signal suffisamment élevé pour les rendre suffisamment utilisables dans la pratique.

La présente invention a donc pour but d'augmenter encore le seuil de sensibilité d'un capteur biochimique par une méthode d'amplification n'ayant pas les inconvénients de l'art antérieur, en étant en particulier plus simple à mettre en oeuvre et moins coûteuse.

5 A cet effet, l'invention a pour objet un capteur biochimique à amplification moléculaire d'un signal pour la détection et le dosage d'une entité biologique en milieu biotique, cette entité biologique pouvant comprendre des oligonucléotides, des peptides ou des polysaccharides. Le système d'amplification est caractérisé en ce qu'on ajoute au milieu
10 biotique des composés monomères et des unités catalytiques capables de catalyser à partir de l'extrémité d'un brin élémentaire de l'entité biologique un enchaînement polymère à partir desdits composés monomères en augmentant ainsi localement un paramètre physique mesurable à la surface du capteur.

15 Les unités catalytiques sont des enzymes choisies parmi toutes les classes de transférases, polymérases et synthétases qu'il est possible d'utiliser, soit individuellement, c'est-à-dire en ne choisissant qu'une seule espèce d'enzyme, soit en choisissant plusieurs enzymes qu'on utilise en combinaison ou qu'on ajoute de façon séquentielle au
20 milieu biotique.

Parmi les unités catalytiques préférées, on peut citer une transférase spécifique à l'ADN ou à l'ARN simple qui allonge le brin oligonucléotide.

25 Les composés monomères, qui sont ajoutés au milieu biotique pour augmenter localement la masse par polymérisation, sont choisis de préférence parmi les acides nucléiques : NTP ou dNTP; où N = A (Adénosine), C (Cytidine), G (Guanosine) ou T (Thymidine) et d = déoxy.

30 Les peptidases, utilisées sous des conditions qui favorisent la réaction inverse, permettent la synthèse de matériaux protéiniques. Lorsqu'on veut obtenir une augmentation locale de masse des hydrates de carbone par une addition séquentielle d'enzymes, on choisit de préférence des monosaccharides transférases.

35 Comme indiqué précédemment, la détection et le dosage d'une entité chimique en milieu biotique repose fondamentalement selon l'invention sur une augmentation d'un paramètre mesurable, tel que la masse, à la surface même du capteur.

Selon un premier mode de détection, la surface du capteur a un agencement en réseau ou en gradient de réseau permettant de détecter, par exemple par des moyens optiques dans le champ d'évanescence une variation de l'indice de réfraction résultant de la
5 variation de masse à la surface capteur, cette variation étant en corrélation avec le dosage de l'entité biochimique.

Selon un deuxième mode de détection, les composés monomères ajoutés au milieu biotique sont marqués avec un chromophore ou un fluorophore, de sorte que le polymère formé va augmenter localement la
10 densité de marquage et permettre d'effectuer une mesure de fluorescence corrélable avec le dosage de l'entité biochimique.

Ces deux modes de détection sont donnés à titre d'exemples, mais le système capteur selon l'invention est adaptable à tout autre type de biocapteur sensible à une augmentation d'un paramètre
15 physique, telle la masse à sa surface.

Il est donc nécessaire de maintenir à la surface du capteur le brin élémentaire de l'entité élémentaire permettant, par exemple, l'accroissement de masse par polymérisation à partir de l'une de ses extrémités. A cet effet, le substrat subit un traitement approprié,
20 expliqué plus en détail par la suite, qui permet d'immobiliser directement ou indirectement l'unité de détection.

L'immobilisation directe de l'unité de détection s'effectue par une interaction covalente ou non covalente avec l'entité chimique à détecter, ladite interaction pouvant être unidirectionnelle en étant par exemple
25 établie par une des extrémités de la séquence de nucléotides.

Cette immobilisation peut également être réalisée en utilisant un agent de réticulation photopolymérisable.

Lorsque l'immobilisation est effectuée de façon indirecte, on utilise une charpente moléculaire qui permet d'immobiliser un plus grand
30 nombre d'unités de détection, ladite charpente moléculaire étant elle-même liée à la surface du biocapteur par une unité d'accrochage. De façon optimale, cette unité d'accrochage a une grande affinité pour interagir avec les molécules de détection. De telles interactions sont par exemple des interactions du type (premier anticorps)-(deuxième anticorps), comme c'est le cas dans les protocoles de test ELISA
35 généralisés, ou des interactions de type ADN/ADN comme c'est le cas dans les dispositifs biocapteurs à base d'ADN.

De nombreuses structures peuvent être utilisées pour former la charpente moléculaire, parmi lesquelles on peut citer :

- de petites entités moléculaires qui permettent au moins une double fonctionnalisation, tel qu'un agent de réticulation hétéro-bifonctionnel par exemple N-(m-(trifluorométhyl)diazirin-3yl)phényl)-4-maléimido-butyramide,

- un anticorps modifié avec un oligonucléotide ou un de ses fragments. La fraction hydrocarbonée et le domaine-clef des anticorps possèdent des groupes fonctionnels telles que des chaînes latérales carbohydrates et amino-acides qui respectivement facilitent l'addition d'oligonucléotides,

- des dendrimères ADN de tailles appropriées, qui présentent un grand intérêt en raison de leur aptitude à de multiples fonctionnalisations pour les oligonucléotides spécifiques. Des extensions à brin unique de dendrimères ADN permettent de fixer des anticorps fonctionnalisés à l'aide d'oligonucléotides,

- des colloïdes de métaux ou de composés nanocristallins semiconducteurs qui procurent les éléments essentiels pour une fonctionnalisation multiple.

L'unité d'accrochage qui établit une liaison sélective entre la charpente moléculaire et la molécule de détection est, dans un mode de réalisation préféré, formée par une partie d'une molécule identique à l'unité de détection, tel qu'un anticorps, ou par un fragment de celle-ci. Parmi les unités d'accrochage utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- toutes les classes d'immunoglobulines, la protéine A, la protéine G, la protéine fusionnée A-G,

- l'avidine, la neutravidine, la streptavidine et des oligonucléotides qui occupent un quart des sites individuels de liaison biotine,

- une polyhistidine marquée,

- un nitrolo-tetraacétate marqué,

- n'importe quel genre d'interaction moléculaire à liaison spécifique mais non covalente.

En fonction des caractéristiques de la charpente moléculaire, et notamment lorsqu'elle a une architecture dendrimère, l'unité de liaison polymère peut être un oligonucléotide avec une séquence de nucléotides en partie complémentaire de l'une des branches d'un dendrimère.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la description suivante faite en référence aux dessins annexés dans lesquels :

- les figures 1A, 1B et 1C représentent schématiquement les
- 5 étapes conduisant à un premier mode de réalisation,
- la figure 2 est une représentation schématique d'un deuxième mode de réalisation, et
- les figures 3A et 3B montrent schématiquement un troisième mode de réalisation.

10 On va maintenant décrire un premier mode de réalisation d'un système capteur le plus simple selon l'invention, en référence aux figures 1A, 1B et 1C où on a schématiquement représenté les étapes permettant d'amplifier un signal.

La première étape (figure 1A) montre un capteur 1 à la surface 2
15 duquel est immobilisé un oligonucléotide 3 par son extrémité 3'. Cet oligonucléotide 3 est désigné plus généralement par "molécule de détection" 4. Cette immobilisation peut être effectuée, soit par un traitement approprié de la surface du capteur pour permettre l'établissement d'une liaison covalente avec l'extrémité 3' de
20 l'oligonucléotide 3, soit par un procédé thermochimique ou encore par une technique de photo-immobilisation au moyen d'un agent de réticulation photopolymérisable, comme cela sera expliqué plus en détail dans les exemples qui suivent. Cette molécule de détection comporte une séquence de nucléotides spécifique qui va permettre par hybridation
25 (figure 1B) d'immobiliser un brin élémentaire 5 de l'entité biochimique 6 à analyser, ce brin élémentaire ayant une séquence de nucléotides complémentaire de celle de la molécule de détection 4. Cette hybridation est effectuée en laissant libre l'extrémité 3' du brin élémentaire 5. Dans l'étape suivante (figure 1C), on a ajouté des nucléotides monomères 7, désignés par la suite par l'abréviation usuelle dNTP, et une enzyme 10,
30 telle qu'une transférase à extrémité 3'. Cette enzyme 10 va catalyser spécifiquement la formation de liaisons covalentes entre l'extrémité 3' du brin élémentaire 5 et successivement les nucléotides ajoutés au milieu pour créer un enchaînement polymère 9 qui va augmenter la masse
35 totale à la surface, ce qui va se traduire par une variation mesurable de l'indice de réfraction. Dans le cas où les nucléotides ajoutés au milieu sont marqués avec un marqueur fluorescent, cette augmentation de

masse va se traduire par une accumulation de nucléotides marqués à la surface du capteur et une diminution globale de la fluorescence du milieu.

En se référant maintenant à la figure 2, on a représenté schématiquement un système capteur selon l'invention correspondant à un mode d'amplification plus complexe, en ce que les oligonucléotides 3 sont indirectement liées à la surface 2 du capteur 1 par l'intermédiaire d'une charpente moléculaire 20 immobilisée à la surface du capteur par une unité d'accrochage 30. Dans l'exemple représenté, la charpente moléculaire 20 est formée par un colloïde bifonctionnalisé pour retenir à la fois les oligonucléotides 3 attachés par l'extrémité 5' et un fragment d'anticorps 31 complémentaire d'un antigène 32 immobilisé à la surface, l'anticorps 31 et l'antigène 32 réalisant ensemble l'accrochage. Pour effectuer l'amplification du signal, on procède comme indiqué précédemment en ajoutant une enzyme 10 et des nucléotides 7.

La description ci-après donne en détail les différentes étapes qui permettent d'obtenir un système capteur biochimique selon l'invention et les modifications qu'il convient d'apporter à la surface d'un capteur optique du type de ceux qui reposent sur une détection de fluorescence ou sur une détection réfractométrique. Avec de petites modifications, les procédures décrites s'appliquent aussi à d'autres systèmes capteurs et à d'autres matériaux de transducteurs. Une modification de surface par silanisation convient aux surfaces qui donnent des groupes hydroxy de surface ou aux surfaces sur lesquels on peut produire des groupes hydroxy. D'une autre façon, on utilise aussi les technologies de photo-immobilisation pour fonctionnaliser une surface quand on souhaite avoir une fonctionnalisation de surface adressable et supprimer du milieu les liaisons non spécifiques de l'entité biologique. En principe, les matériaux employés pour le capteur sont des oxydes métalliques à la fois pour les mesures basées sur la réfractométrie et pour celles basées sur la fluorescence. Les modifications par charpente moléculaire amplificatrice ont été effectuées avec des colloïdes d'or et des dendrimères à plusieurs branches. Dans tous les exemples décrits ci-après, on a effectué l'amplification du signal avec la transférase à extrémité 3' (3'TT) pour catalyser l'addition de nucléotides à l'extrémité libre 3'.

I. Fonctionnalisation de la surface du capteur et immobilisation de l'unité de détection

Silanisation de la surface d'un oxyde métallique et liaison d'un

5 oligonucléotide

En partant des protocoles de R. E. Kunz décrits dans les publications "Sensor and Actuators A (1997) 60,23" et "Sensors and Actuators B (1997) 38-39, 705", on a augmenté le nombre de radicaux hydroxy en traitant les capteurs optiques répliqués sur des polymères organiques avec un plasma d'oxygène dans un générateur de plasma. On a nettoyé les systèmes capteurs optiques sur verre par ultrasons dans l'acide nitrique 65% pendant trente minutes (30 mn), puis par rinçage à l'eau bidistillée. Les surfaces externes d'oxyde métallique ont été silanisées en phase vapeur avec du 3-(glycidyloxy) propyl-triméthoxysilane pendant deux jours à 180°C et 10 mbar. On a enfin immobilisé sur les surfaces époxy ainsi obtenues, des oligonucléotides commerciaux à chaîne terminale 3' ou 5' amino préalablement dissous dans un tampon de phosphate de sodium dilué à 1/100.

20 Immobilisation d'oligonucléotides par l'intermédiaire de polymères photopolymérisables

Selon un protocole de photoimmobilisation de protéine décrit par H. Gao et al (Biotechnol. Appl. Biochem. (1994) 20, 251-263), la technique d'immobilisation adressable de biomolécules a été étendue à la liaison covalente d'oligonucléotides. Tout à la fois, le revêtement en couches et l'immobilisation en une seule étape se sont révélés applicables aux nucléotides. Au lieu d'utiliser de l'albumine de sérum bovin arylidiazirine modifié, on a employé à titre de nouveau réactif comme polymère photopolymérisable un dextrane arylidiazirine modifié. Un dextrane arylidiazirine modifié (T-Dextran) a été synthétisé par thiocarbamoylation de l' amino-dextrane avec la 3-(trifluorométhyl)-3-(m-isothiocyanophényl) diazirine. Pour la photoimmobilisation des oligonucléotides, on a préparé une solution contenant 20 nanomoles de T-Dextran et 10 nanomoles d'oligonucléotides en solution dans un milieu tampon à pH 7,4 (1,5 mM de NaCl et 0,05 mM de phosphate de sodium).

On a utilisé ce mélange pour imprimer par jet d'encre une surface de 10 mm^2 , ce qui correspond à une densité de 500 fmol/mm^2 , soit encore 5 nl pour une surface de $3 \times 3 \text{ mm}$. Une fois ce dépôt effectué, on sèche les échantillons à température ambiante pendant 2 h à 5 20 mbar, puis on les expose à la lumière pour activer la réticulation du polymère. Cette immobilisation a été effectuée par une irradiation de trois minutes avec une source de lumière Orvel (11 mW/cm^2) avec un filtre pour éliminer les radiations inférieures à 320 nm. Les surfaces modifiées sont lavées par plusieurs solutions tampons et finalement cinq 10 fois à l'eau bidistillée. Par un marquage isotopique, on a pu déterminer que 40% des oligonucléotides étaient immobilisés sur le capteur, ce qui correspond approximativement à une densité de 200 fmol/mm^2 .

Immobilisation orientée d'oligonucléotides

15 Pour avoir une immobilisation orientée d'oligonucléotides, on a préparé des substrats ayant à leur surface du nitrure de silicium, des polymères organiques, du diamant ou encore du DLC (Diamond-like Carbon). Les substrats de base, à l'exception des polymères organiques, sont lavés aux ultrasons successivement 5 mn chaque fois 20 dans de l'hexane et dans de l'éthanol et séchés pendant deux heures à température ambiante à 6 mbar. On dépose ensuite avec une seringue une goutte d'une solution éthanolique 0,25 mM de l'agent de réticulation N-(m-(trifluorométhyl)diazirin-3yl)phényl)-4-maléimido-butynamide. Une goutte de $10 \mu\text{l}$ permet de couvrir une surface de 25 mm^2 . Après 25 séchage de deux heures à température ambiante à 30 mbar, on effectue la photoimmobilisation en irradiant les échantillons pendant 20 mn avec une source lumineuse Stratalinker à 350 nm procurant une irradiation de $0,9 \text{ mW/cm}^2$. On lave ensuite les surfaces modifiées trois fois avec de l'hexane et de l'éthanol; dans le cas d'un polymère 30 organique utilisé comme substrat, on utilise le méthanol comme produit de lavage. Pour obtenir une immobilisation covalente, on dissout 10 nmol de 5'thio-oligonucléotide dans $50 \mu\text{l}$ d'une solution tampon dégazée à pH 7,7 (0,2 M HEPES + 1 mM EDTA). Cette solution est ensuite déposée par pipettage sur la surface maléimide modifiée et mise à 35 incubé pendant seize heures à température ambiante. En dernier lieu, comme expliqué plus loin, on rince la surface oligonucléotide modifiée avec la solution tampon d'hybridation.

II. Préparation de la charpente moléculaire

Fonctionnalisation de colloïdes d'or avec des oligonucléotides et des fragments d'anticorps F(ab')

5 On effectue la sédimentation de colloïdes d'or de 20 nm de diamètre (10'000 tours/mn, pendant 30 mn) puis on élimine le surnageant et on ajoute une solution contenant 0,7 nmol de 5'thio-oligonucléotides et 0,3 nmol de fragments F(ab') fraîchement préparés
10 dissous dans 50 µl d'une solution tampon dégazée à pH 7,7 (0,2 M HEPES + 1 mM EDTA). On garde la solution seize heures à température ambiante et on lave les colloïdes modifiés en effectuant trois cycles de sédimentation et de remise en suspension dans un tampon de phosphate de sodium.

15

Charpente moléculaire de tri et multidentates d'ADN

Avec une structure ADN tridentée, on a un ADN à deux extrémités 3'OH et pour la première génération de dendrimère avec cinq extrémités 3'OH.

20 L'architecture dendrimère de cette charpente moléculaire a été préparée comme indiqué dans les brevets de la société Polyprobe (US 5,175,270; US 5,484,904; US 5,487,973). On a sélectionné des séquences d'oligonucléotides ADN en tenant compte d'une liaison efficace du brin complémentaire. On a assemblé (figure 3A) une structure
25 dendrimère de base 41 en laissant libres les deux extrémités 3' pour l'amplification 3'TT, une extrémité 5' étant complémentaire de la molécule de détection immobilisée à la surface. Cet assemblage moléculaire permet de dupliquer le nombre de sites d'extension 3'TT. Les charpentes moléculaires de dendrimères de première génération ont été
30 conçues de façon analogue. L'addition d'un dendrimère tétradenté (40) et d'un deuxième étage aux dendrimères tridentés (41) et bidentés (42) a porté le nombre de sites d'extension 3'TT à cinq (figure 3B).

III. Hybridation de brins de ADN complémentaires et réaction de transférase à extrémité 3'

Hybridation des oligonucléotides d'ADN avec les molécules de détection

5 immobilisées à la surface

On a effectué la réaction d'hybridation avec les molécules de détection immobilisée à la surface, c'est-à-dire avec 15 à 60 nucléotides. Après immobilisation des molécules ADN de détection, on a lavé les surfaces trois fois avec une solution de 5xSSC contenant 10 0,1% en poids de dodecylsulfate de sodium pour éliminer les oligonucléotides adsorbés de façon non covalente. On a ensuite dissous des brins élémentaires d'ADN à chaîne unique dans 250 ml d'une solution d'hybridation comprenant en poids 1% de caséine, 0,1% de sel sodique de lauroylsarcosine et 0,02% de dodecylsulfate de sodium dans une 15 solution tampon de 5xSSC.

La solution ainsi obtenue a été déposée à la surface du capteur et on a laissé incuber deux heures à 45°C. Après l'étape d'hybridation, on a lavé les surfaces deux fois avec 2 x SSC contenant du dodécylsulfate de sodium à 0,1% en poids à température ambiante et trois fois avec 20 une solution tampon 5 x SSG, contenant du dodecylsulfate de sodium à 0,1% en poids, chauffée à 50°C. Ces opérations de lavage intensif incorporant des détergents sont nécessaires pour éliminer les brins élémentaires non hybridés.

25 Réaction de la transférase à extrémité 3'(réaction 3'TT)

Dans l'étape suivante, on a ajouté aux brins élémentaires hybridés des nucléotides, ayant ou non un marqueur fluorescent, en même temps que l'enzyme 3'TT. Cette enzyme catalyse la liaison des nucléotides avec le brin élémentaire. En ajoutant des monomères aux brins élémentaires, 30 l'enzyme augmente l'indice de réfraction pour la détection de masse ou la fluorescence à la surface du biocapteur. On a d'abord lavé la surface du capteur deux fois avec 200 µl du tampon cacodylate à pH 7 (0,5 M cacodylate, 5 mM CoCl₂, 1 mM dithiothreitol). On a fait démarrer la réaction en ajoutant deux unités de 3'TT à un milieu d'incubation 35 composé de 20 µl de tampon cacodylate, 100 µl d'un déoxynucléotide phosphate (dNTP), 4 µl de 5 mM de dCTP et 100 µl d'eau. Le mélange

a été brièvement mélangé par aspiration avec une pipette et déposé sur le substrat.

Les modifications d'indice de réfraction à la surface du capteur ont été suivies soit de façon optique avec un capteur optique intégré, soit par une détection de fluorescence. On a quantifié l'amplification du signal en effectuant la différence entre le signal le plus élevé obtenu d'une surface ayant le brin élémentaire immobilisé, et le signal provenant d'un capteur de référence dans lequel le brin élémentaire n'a subi aucune hybridation.

10

IV. Amplification du signal dans un test génétique

Test de détection de l'amplification du signal de fluorescence

Dans ce test, des molécules de détection d'ADN ont été immobilisées à la surface du capteur par photo-immobilisation à base de dextrane et hybridées avec les oligonucléotides qui sont, soit un composé témoin synthétique soit un oligonucléotide provenant de PCR. Dans le milieu réactionnel 3'TT, il y a des "dCTP" et des nucléotides fluorescents ChromaTide BODIPY FL-14-dCTP (Molecular Probes, Eugene Oregon, USA). On a initié la réaction d'amplification en ajoutant deux unités de 3'TT et on l'a arrêté après cinq minutes en lavant la surface du capteur avec la solution tampon de la réaction. On a suivi l'augmentation de fluorescence à la surface et comparé les résultats avec la fluorescence après hybridation d'une molécule de détection marquée à la fluoresceine.

Dans une deuxième série d'expériences, on a hybridé l'oligonucléotide à la fois à la branche de liaison de la première génération de dendrimères et à la molécule de détection liée à la surface. Avec cette configuration, la réaction 3'TT a lieu avec cinq extrémités 3' disponibles sur la charpente moléculaire.

On a enregistré l'incorporation des composés dCTP fluorescents. Les résultats expérimentaux montrent que le signal est augmenté d'un facteur 3,8 comparativement à celui d'un biocapteur agencé sans dendrimères.

35

V. Amplification du signal 3'TT dans des tests immunologiques

On a examiné la liaison d'un anticorps à un antigène photoimmobilisé en utilisant la détection optique intégrée sans marqueur telle que décrite par H. Gao et al (Biosensors and Bioelectronics (1995) 10, 317-328). On a effectué le test avec un anticorps non modifié et, dans une deuxième série d'expériences, avec un anticorps fonctionnalisé avec un oligonucléotide. On a effectué la fonctionnalisation de l'anticorps comme indiqué par Ghosh et al (Bio-conjugate. Chem. (1990) 1,71-76). L'amplification du signal secondaire par la réaction 3'TT a été effectuée à la fois pour les deux systèmes de tests. Le milieu réactionnel comprenait des "dCTP" et deux unités de l'enzyme 3'TT. On a suivi en fonction du temps l'augmentation de masse en observant les modifications de l'indice de réfraction. La vitesse initiale de réaction et le niveau de saturation se sont révélés 64 fois plus grands avec l'échantillon comprenant l'anticorps modifié par les oligonucléotides qu'avec l'échantillon sans oligonucléotides.

On a atteint une augmentation d'un facteur 150 pour la sensibilité de détection d'une entité biologique avec une charpente moléculaire à colloïdes d'or bifonctionnalisée en ayant à sa surface à la fois des fragments d'anticorps spécifiques d'un antigène et des oligonucléotides. On a utilisé cet agencement moléculaire pour amplifier le signal d'un biocapteur immunologique. Comme décrit ci-dessus, on a modifié des particules d'or colloïdal de 10 nmoles avec des oligonucléotides et des fragments F(ab') dans une proportion de 7/3. On a ensuite appliqué à la surface du biocapteur ces colloïdes d'or bifonctionnalisés en même temps que deux unités 3'TT et on a enregistré l'augmentation de masse en fonction du temps. Le déterminant antigénique du fragment F(ab') immobilisé sur le colloïde s'oriente vers un épitope d'anticorps du test ELISA. L'amplification du signal en fonction de la masse a été obtenu d'abord au moyen d'une liaison sélective des colloïdes substitués. L'augmentation de la chaîne d'oligonucléotides provoquée par la réaction 3'TT conduit à une très forte augmentation du signal. Cela conduit finalement à l'amplification à saturation 150 fois supérieure à celle d'un échantillon sans colloïde.

REVENDEICATIONS

1. Système capteur biochimique à amplification moléculaire d'un signal pour la détection et le dosage d'une entité biologique en milieu biotique, ladite entité biologique étant identifiable par au moins un brin élémentaire comprenant une séquence spécifique de nucléotides, ledit
5 capteur ayant à sa surface une unité de détection immobilisée directement ou indirectement, ladite unité de détection possédant une séquence de nucléotides complémentaire de celle de l'entité biologique et ladite surface du capteur étant agencée pour délivrer à des moyens de détection et de mesure un signal représentatif de la variation d'un
10 paramètre physique par hybridation de l'entité biologique avec l'unité de détection, caractérisé en ce qu'on ajoute au milieu biotique des composés monomères et des unités catalytiques capables de catalyser à partir de l'extrémité d'un brin élémentaire de l'entité biologique un enchaînement polymère à partir desdits composés monomères en
15 augmentant ainsi localement un paramètre physique mesurable à la surface du capteur.
2. Système capteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que ledit paramètre physique mesurable est la masse, l'absorption d'une onde lumineuse ou l'émission d'un signal de fluorescence.
- 20 3. Système capteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que les unités catalytiques sont des enzymes choisies parmi les transférases, les polymérases et les synthétases.
4. Système capteur selon la revendication 3, caractérisé en ce que les enzymes sont ajoutées au milieu biotique en choisissant une seule
25 espèce, en combinant plusieurs espèces, ou en ajoutant séquentiellement plusieurs espèces.
5. Système capteur selon les revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que l'enzyme est une transférase à brin ADN, telle qu'une transférase à extrémité 3', ou une polymérase à brin ARN.
- 30 6. Système capteur selon les revendications 3 ou 4, caractérisé en ce que l'entité biologique est un peptide ou une protéine et en ce que l'enzyme est une synthétase peptidée.
7. Système capteur selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'entité biologique est un di-ou oligo-saccharide et en ce que les

enzymes ajoutées de façon séquentielle comprennent une mono- ou oligo-saccharide transférase.

8. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que les composés monomères sont choisis parmi les
5 nucléotides et les oligonucléotides

9. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que la surface du capteur a un agencement en réseau ou en gradient de réseau permettant une détection optique de la variation de l'indice de réfraction, liée à la variation de masse à la
10 surface du capteur, cette variation d'indice de réfraction étant corrélable avec le dosage de l'entité biochimique.

10. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que les composés monomères sont marqués avec un chromophore ou un fluorophore permettant d'effectuer une mesure
15 d'absorption ou de fluorescence corrélable avec le dosage de l'entité biochimique.

11. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que la séquence de nucléotides formant l'unité de détection est directement liée à la surface du capteur par liaison
20 covalente.

12. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que l'unité de détection est liée de façon unidirectionnelle par son extrémité 3' ou 5'.

13. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que la séquence de nucléotide formant l'unité de
25 détection est liée à la surface du capteur par photo-immobilisation.

14. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que la séquence de nucléotides formant l'unité de détection est indirectement liée à la surface du capteur par une
30 charpente moléculaire bifonctionnelle, elle-même liée à ladite surface par une unité d'accrochage.

15. Système capteur selon l'une des revendications 1 à 14, caractérisé en ce que les composés permettant de former la charpente moléculaire sont choisis parmi, une entité moléculaire bifonctionnelle, tel
35 qu'un agent de réticulation hétérobifonctionnel, un anticorps modifié par un nucléotide ou l'un de ses fragments, des dendrimères ADN de taille

appropriée, et des colloïdes de métaux ou de composés nanocristallins semiconducteurs.

16. Système capteur selon la revendication 14, caractérisé en ce que les composés permettant de former l'unité d'accrochage sont
5 choisis parmi les immunoglobulines, la protéine A, la protéine G, et la protéine fusionnée A-G.

17. Système capteur selon la revendication 14, caractérisé en ce que les composés permettant de former l'unité d'accrochage sont choisis parmi l'avidine, la neutravidine, la streptavidine et des
10 oligonucléotides ADN ou ARN occupant un quart des sites de liaison biotine.

18. Système capteur selon la revendication 14, caractérisé en ce que les composés permettant de former l'unité d'accrochage sont choisis parmi une polyhistidine marquée et un nitroloacétate marqué.

15 19. Système capteur selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'unité d'accrochage est formée par un oligonucléotide ayant une séquence de nucléotides partiellement complémentaire de l'une des branches d'un dendrimère lorsque la charpente moléculaire a une architecture dendrimère.

Fig 1A

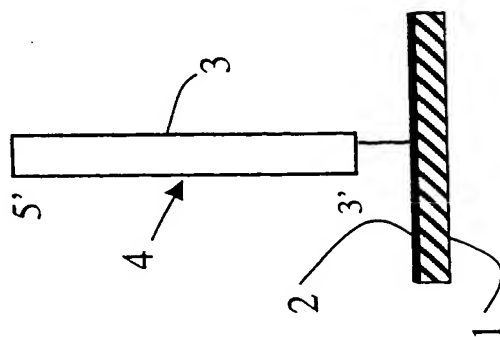


Fig 1B

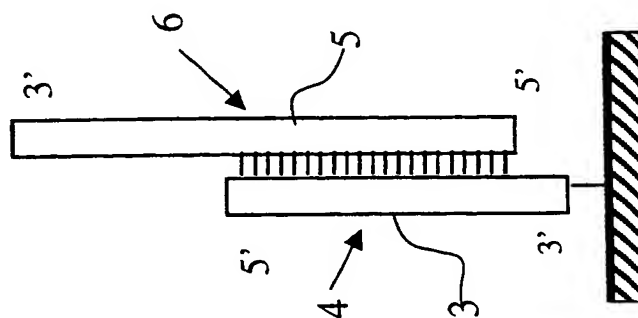


Fig 1C

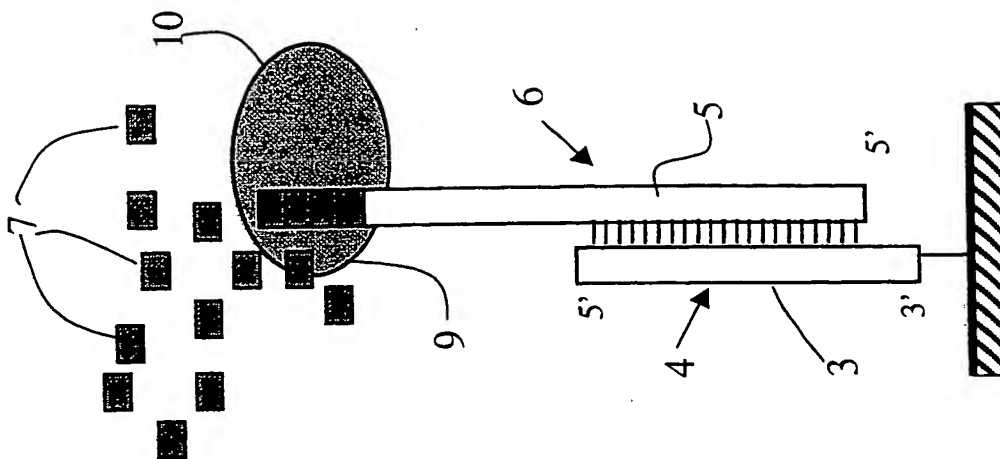


Fig 2

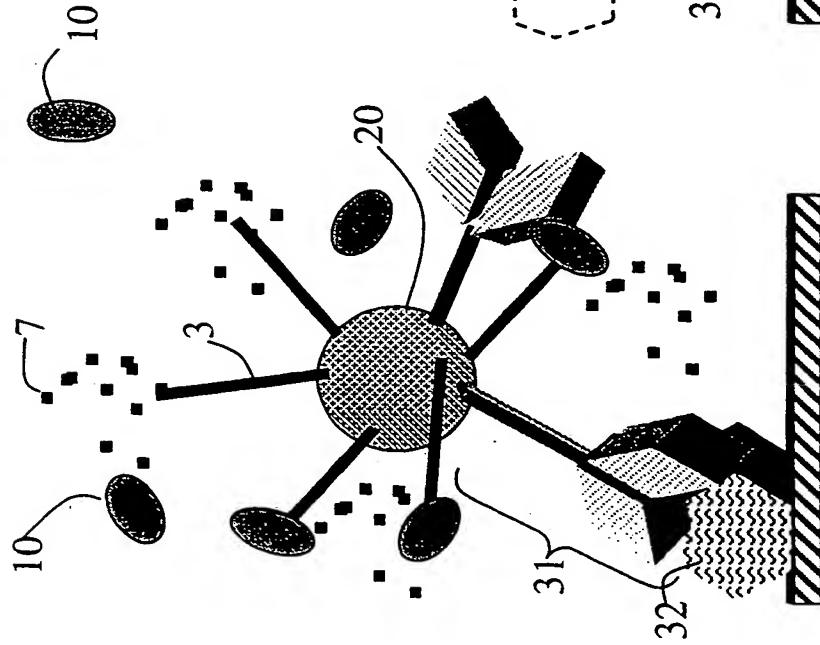


Fig 3A

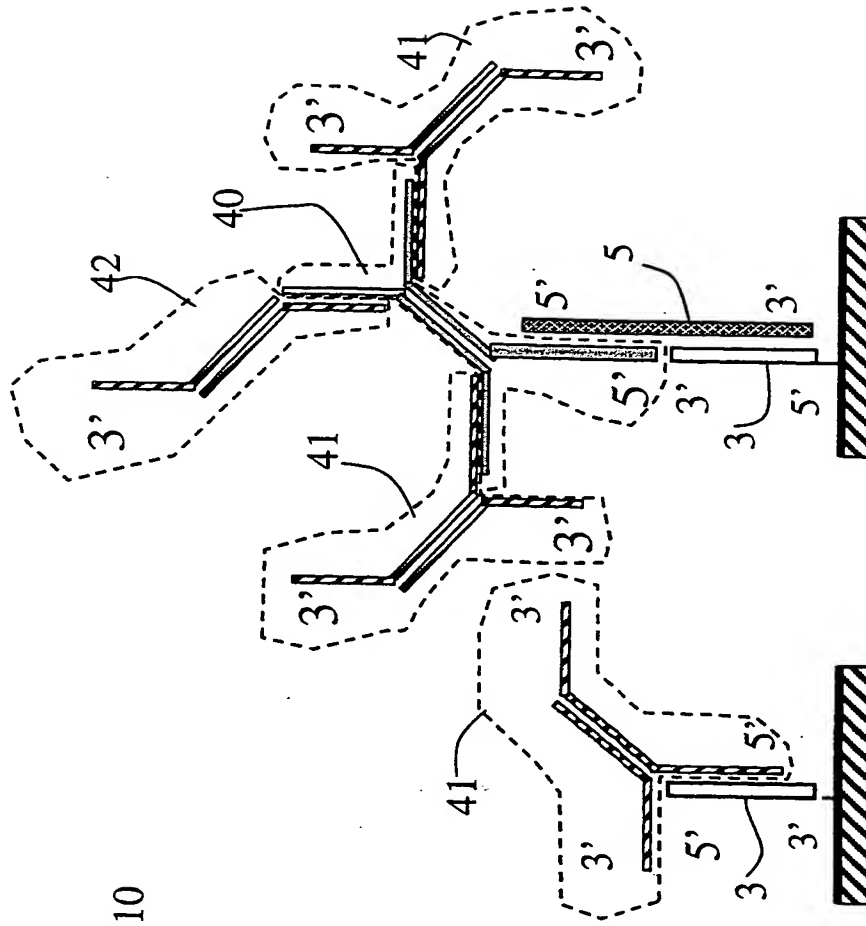


Fig 3B

